

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Waktu penelitian dilakukan dari bulan februari sampai bulan agustus 2019. Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Riset dan Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Kimia, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI).

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini bermacam-macam tergantung pada jenis pekerjaan yang dilakukan. Untuk pembuatan pelarut menggunakan pH meter (Me204 Mettler Toledo), *magnetic stirrer*, batang magnet, neraca analitik, kaca arloji, gelas kimia 1 L, spatula, corong kaca. Untuk ekstraksi dan pemurnian fikosianin menggunakan *magnetic stirrer*, batang magnet, *centrifuge* (H-103n Kokusan), *falcon tube* 15 mL, labu erlenmeyer 250 mL, membran selulosa dialisis, neraca analitik, kaca arloji, spatula, dan gelas kimia 500 mL. Seperangkat alat *freeze dry* untuk pengeringan pigmen fikosianin. Seperangkat alat elektroforesis SDS-PAGE (Mini-PROTEAN Tetra Cell-BIO-RAD). Untuk pengukuran spektrum UV-Vis menggunakan spektroskopi UV-Vis Shimadzu Uv-Mini 1240. Untuk pengukuran spektrum IR menggunakan FTIR Prestige 21 Shimadzu. Untuk pengukuran stabilitas antioksidan fikosianin menggunakan botol vial 30 mL, botol vial 10 mL, pipet ukur 2 mL dan 5 mL, labu ukur 100 mL dan spektroskopi UV-Vis Shimadzu Uv-Mini 1240.

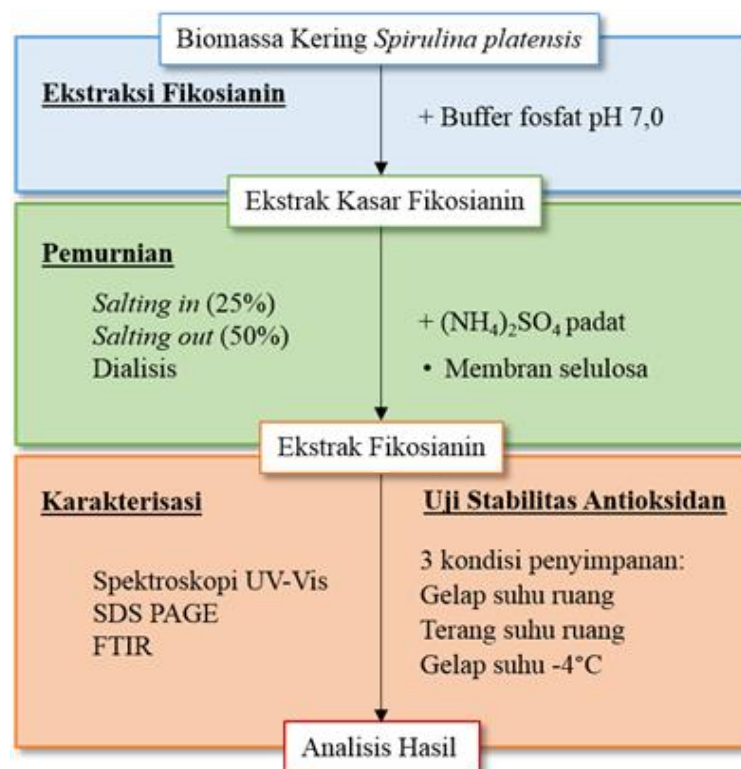
3.2.2. Bahan

Sampel *Spirulina platensis* diperoleh dari Departemen Biologi Universitas Padjajaran. Bahan yang digunakan dalam pembuatan pelarut adalah aquades, natrium fosfat (NaH_2PO_4 , teknis), dinatrium fosfat (Na_2HPO_4 , teknis). Amounium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, teknis), barium klorida (BaCl_2 , teknis) dan alumunium foil digunakan pada proses pemurnian. Kalium bromida (KBr, p.a) digunakan sebagai

bahan pembawa pada pengukuran spektrum FTIR. Bahan untuk karakterisasi SDS-PAGE meliputi 40% poliakrilamid, 10% SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*), *marker* (Peggold), dan *coomasie blue*. DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil-hidrat) dan metanol (CH₃OH, p.a) digunakan untuk pengujian antioksidan.

3.3. Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari empat tahap, yaitu: 1) Ekstraksi fikosianin dari *Spirulina platensis*, 2) Pemurnian fikosianin dengan metode pengendapan oleh amonium sulfat dan dialisis, 3) Karakterisasi fikosianin, dan 4) Pengamatan stabilitas antioksidan fikosianin. Alur penelitian tersebut divisualisasikan seperti pada **Gambar 3.1**.

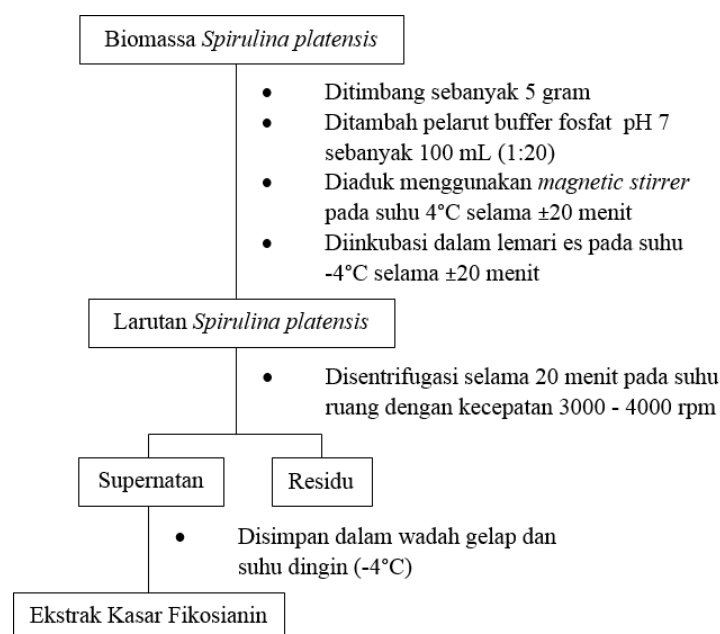


Gambar 3.1. Alur penelitian

3.3.1. Ekstraksi Fikosianin

Tahap ekstraksi fikosianin menggunakan metode maserasi yang mengacu pada penelitian sebelumnya (Kamble *et al.*, 2013) dan dilakukan beberapa penyesuaian. Ekstraksi fikosianin menggunakan larutan buffer fosfat sebagai

pelarut dengan perbandingan 1:20 (w/v) yang didasarkan pada metode yang dilakukan oleh Wang (2017). Pada ekstraksi tersebut biomassa *Spirulina platensis* ditimbang sebanyak 5 gram dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer, lalu ditambahkan larutan buffer fosfat sebanyak 100 mL, dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 4°C selama ± 20 menit. Larutan tersebut kemudian diinkubasi lebih lanjut dalam lemari es pada suhu -4°C selama ± 20 menit. Setelah inkubasi tersebut larutan kemudian di sentrifugasi selama 20 menit pada suhu ruang dengan kecepatan 3000 – 4000 ppm. Supernatan hasil sentrifugasi merupakan ekstrak kasar fikosianin dan disimpan dalam wadah gelap dengan suhu dingin (-4°C). Tahap ini divisualisasikan pada **Gambar 3.2**.

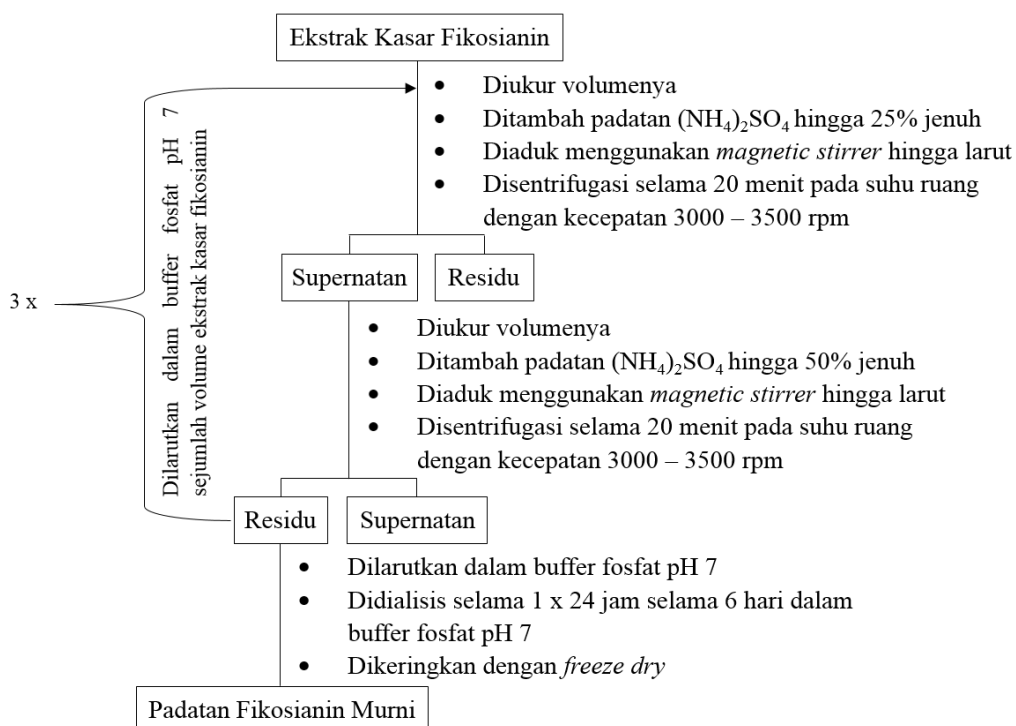


Gambar 3.2. Tahapan ekstraksi fikosianin

3.3.2. Pemurnian Fikosianin

Pemurnian fikosianin dilakukan dengan metode *salting out* oleh garam amonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) yang didasarkan pada metode sebelumnya (Munawaroh *et al.*, 2018). Proses pemurnian meliputi penjenjuran amonium sulfat 25% dan penjenjuran amonium sulfat 50% yang dilakukan sebanyak 3 kali. Pada penjenjuran 25% akan diperoleh residu berwarna kehijauan dan supernatan berwarna biru. Kemudian pada supernatan tersebut dilakukan penjenjuran 50% yang akan memperoleh residu warna biru dan supernatan tak berwarna. Residu dari

penjenuhan 50% dilarutkan kembali dengan buffer fosfat kemudian didialisis menggunakan membran selulosa untuk menghilangkan amonium sulfat yang masih tersisa. Pemurnian 4 (dialisis) fikosianin dilakukan selama 6 hari dengan penggantian pelarut buffer fosfat pH 7 sebanyak 1 kali perhari. Pelarut buffer fosfat pH 7 diuji dengan BaCl_2 untuk memastikan amonium sulfat telah keluar seluruhnya. Setelah didialisis fikosianin dikeringkan dengan metode *freeze dry*. Tahapan pemurnian fikosianin divisualisasikan pada **Gambar 3.3**.



Gambar 3.3. Tahapan pemurnian fikosianin

Konsentrasi fikosianin ditentukan secara spektroskopi melalui persamaan berikut (Munawaroh *et al.*, 2018). Kadar kemurnian fikosianin dapat dihitung secara kuantitatif dengan cara menghitung absorbansi yang didapat dari hasil ekstraksi. Kemurnian ini diukur berdasar rasio A_{620}/A_{280} (Lorenz, 1998).

$$\text{Konsentrasi Fikosianin (mg/mL)} = \frac{A_{620} - 0,474(A_{652})}{5,34}$$

$$\text{Kemurnian Fikosianin} = \frac{A_{620}}{A_{280}}$$

3.3.3. Karakterisasi Fikosianin dengan SDS-PAGE

Pada penelitian ini, karakterisasi fikosianin dengan menggunakan SDS-PAGE dilakukan di Laboratorium Pusat Riset Bioteknologi Molekuler dan Bioinformatika Universitas Padjajaran.

Sampel yang di uji karakterisasi yaitu ekstrak kasar, fikosianin hasil pemurnian 3, dan fikosianin hasil pemurnian 4 (dialisis). Elektroforesis sampel dalam gel poliakrilamid dilakukan menggunakan 40% poliakrilamid dengan 10% SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*). Penanda molekuler/*marker* (Peggold) digunakan untuk mengidentifikasi pita fikosianin.

Elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 V, selama 100 menit. Setelah elektroforesis, gel diwarnai dengan *coomassie blue* lalu didiamkan selama semalam. Gel dibilas dengan cara direndam dalam larutan *destaining* yaitu, campuran metanol dan asam asetat (1:1) lalu didiamkan selama semalam.

3.3.4. Karakterisasi Fikosianin dengan FTIR

Pada penelitian ini, karakterisasi fikosianin dengan menggunakan spektroskopi FTIR dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung.

Padatan ekstrak kasar, fikosianin hasil pemurnian 3 dan fikosianin hasil pemurnian 4 (dialisis) masing-masing digerus hingga homogen bersama kalium bromida (KBr) untuk mendapatkan tiga serbuk, kemudian serbuk yang telah disiapkan dibuat menjadi pelet dengan menggunakan *pressure* 10 x 1.000 kg, spektrum direkam menggunakan spektrofotometer inframerah (FTIR Prestige 21 Shimadzu) dari 400 cm⁻¹ sampai 4500 cm⁻¹.

3.3.5. Stabilitas Antioksidan Fikosianin

Dilakukan pengujian terhadap stabilitas aktivitas antioksidan larutan fikosianin pada konsentrasi 175 ppm dan 350 ppm dengan perbedaan tiga kondisi yaitu; gelap suhu ruang, terang suhu ruang, dan gelap suhu -4°C. Larutan fikosianin didiamkan pada 3 kondisi tersebut selama 6 hari. Pengujian stabilitas antioksidan dilakukan setiap hari menggunakan metode DPPH yang didasarkan pada Berset

(1995). Masing-masing sampel fikosianin dipipet sebanyak 4 mL kedalam botol vial yang ditutupi alumunium foil. Kemudian ditambahkan larutan DPPH 40 ppm dalam metanol sebanyak 2 mL. Campuran dikocok hingga homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm. Tahapan ini divisualisasikan pada **Gambar 3.4**.

Pengukuran absorbansi sampel pada penelitian ini dilakukan sebanyak 3 kali pengukuran (triplo) yang selanjutnya digunakan untuk menghitung % inhibisi aktivitas radikal bebas (Q). Persen inhibisi dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

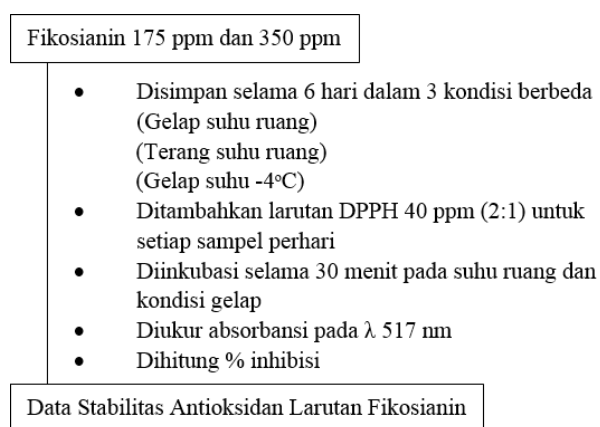
$$Q = \left(\frac{A_0 - A_c}{A_0} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

Q = Persen inhibisi aktivitas radikal bebas

A₀ = Absorbansi kontrol (pelarut + DPPH)

A_c = Absorbansi sampel (sampel + DPPH)



Gambar 3.4. Tahapan pengukuran stabilitas antioksidan fikosianin